

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 août 2003 (21.08.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/068712 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07B 61/00, C07H 21/00, C07K 1/04, C12Q 1/68

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00464

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
13 février 2003 (13.02.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/01791 13 février 2002 (13.02.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : CNRS
(CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016
Paris (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm,
F-75005 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : NASSOY,
Pierre [FR/FR]; 51 bis, rue du Général Leclerc, F-92130
Issy Les Moulineaux (FR). POTIER, Marie-Claude
[FR/FR]; 42 rue Magenta, F-92600 Asnières (FR). TAL-
INI, M., Luc [FR/FR]; 63, rue Croulebarbe, F-75013
Paris (FR). GIBELIN, Nathalie [FR/FR]; 16, chemin de
la Justice, F-92290 Chatenay Malabry (FR). ROSSIER,
Jean [FR/FR]; 322, rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (FR).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: NOVEL METHOD FOR PRODUCTION OF DNA BIOCHIPS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : NOUVEAU PROCEDE DE PREPARATION DE BIOPUCES A ADN ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a method for production of an activated biochip for covalent fixing of oligonucleotide probes to a solid support by means of a spacer compound of the NHS-PEG-VS type and biochips produced by the above method. The invention further relates to methods for detection of nucleic acids in a sample or methods for screening compounds which may be specifically bound to oligonucleotide probes in which said biochips are used. The invention also relates to detection kits for, quantitative or qualitative analysis of nucleic acids in a sample, comprising said biochips and use of the above as affinity matrix for purification of nucleic acids, for sequencing nucleic acids, for the qualitative or quantitative analysis of the expression of genes or for the study and detection of genetic polymorphism.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à un procédé de préparation d'une biopuce activée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques sur un support solide par l'intermédiaire d'un composé espaceur de type NHS-PEG-VS, ainsi que les biopuces susceptibles d'être obtenues par un tel procédé. L'invention comprend également des méthodes de détection d'acides nucléiques dans un échantillon ou des méthodes de criblage de composés capables de se fixer spécifiquement sur des sondes oligonucléotidiques dans lesquelles sont mises en oeuvre les biopuces selon l'invention. La présente invention a aussi pour objet des kits de détection, d'analyse quantitative ou qualitative d'acides nucléiques dans un échantillon, comprenant de telles biopuces ainsi que l'utilisation de ces dernières comme matrice d'affinité pour la purification d'acide nucléique, pour le séquençage d'acide nucléique, pour l'analyse qualitative ou quantitative de l'expression de gènes ou encore pour l'étude et la détection de polymorphisme génétique.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/068712 A2



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

NOUVEAU PROCEDE DE PREPARATION DE BIOPUCES A ADN ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention est relative à un procédé de préparation d'une biopuce
5 activée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques sur un support solide
par l'intermédiaire d'un composé espaceur de type NHS-PEG-VS, ainsi que les
biopuces susceptibles d'être obtenues par un tel procédé. L'invention comprend
également des méthodes de détection d'acides nucléiques dans un échantillon ou des
méthodes de criblage de composés capables de se fixer spécifiquement sur des sondes
10 oligonucléotidiques dans lesquelles sont mises en œuvre les biopuces selon l'invention.
La présente invention a aussi pour objet des kits de détection, d'analyse quantitative ou
qualitative d'acides nucléiques dans un échantillon, comprenant de telles biopuces ainsi
que l'utilisation de ces dernières comme matrice d'affinité pour la purification d'acide
nucléique, pour le séquençage d'acide nucléique, pour l'analyse qualitative ou
15 quantitative de l'expression de gènes ou encore pour l'étude et la détection de
polymorphisme génétique.

De nombreuses techniques ou dispositifs d'analyse d'échantillons biologiques
ont été développés ces dernières années, en particulier pour l'analyse en parallèle de
grandes quantités d'acides nucléiques ou de protéines, notamment suite à l'essor de la
20 génomique ou de la protéomique.

Parmi ces techniques ou dispositifs, les supports permettant de réaliser l'analyse
à haut débit d'acides nucléiques, tels que les biopuces, ou puces à ADN (dénommés
aussi « micro- ou macroarrays », ou encore « DNA chip ») ont fait l'objet de nombreuses
études.

25 Ces biopuces peuvent être en particulier réalisées à partir d'un support,
généralement solide, fonctionnalisé sur lequel ont été fixés par liaison covalente et
localisés des acides nucléiques donnés (sondes nucléiques) et sur lesquelles des sondes
nucléiques vont se fixer spécifiquement respectivement par appariement (ou hybridation
spécifique) ou par reconnaissance d'un site d'affinité les acides nucléiques que l'on
30 cherche à détecter ou identifier dans l'échantillon biologique.

Parmi les documents décrivant les techniques relatives aux biopuces à ADN, on peut citer en particulier :

- l'article de revue de Wang J. (Nucleic Acids Research, 28, 16, 3011-3016, 2000), qui présente un résumé faisant le point sur les principales techniques connues
5 relatives aux puces à ADN, et le document Schubhart et al. (Nucleic Acids Research, 28, 10, e47, 2000) qui dresse une liste des problèmes auxquels sont confrontés les concepteurs de ces puces ;

- le document brevet délivré sous le N° US 6,030,782, qui décrit un greffage avec une surface mercaptosilanisée, d'acides nucléiques modifiés par un groupe
10 sulhydryle ou disulfure, et l'article de Bamdad (Biophysical Journal, 75, 1997-2003, 1998), qui décrit l'obtention de surfaces présentant des ADN par incorporation de molécules composites, les ADN-thiols, dans des monocouches auto-assemblées (« self-assembled monolayers ou SAMs ») ;

- la demande internationale de brevet publiée sous le N° WO 00/43539 qui
15 propose d'immobiliser des molécules, telles que des oligonucléotides, par le biais de polymères polyfonctionnels (« polymer brushes ») ce qui permet d'augmenter la densité de greffage. Ces polymères peuvent être obtenus à partir de méthacrylate d'hydroxyéthyle, d'acrylamide, ou de vinyl pyrrolidone ;

- la demande internationale de brevet publiée sous le N° WO 00/36145 décrit de
20 son côté une méthode de fabrication de puces à ADN, comprenant la polymérisation sur un substrat de type couche métallique, d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, la fixation d'un agent de réticulation sur le pyrrole fonctionnalisé, puis la fixation d'une sonde biologique (telle qu'un oligonucléotide). L'agent de réticulation peut être bifonctionnel, et par exemple présenter une fonction ester de la N-
25 hydroxysuccinimide et une fonction maléimide ;

- la demande internationale de brevet publiée sous le N° WO 98/20020 qui décrit également l'immobilisation à haute densité d'acides nucléiques sur des supports solides, cette fois-ci par mise en contact d'un acide nucléique contenant un groupement thiol avec un support présentant un groupe réagissant avec ce thiol, éventuellement par
30 l'intermédiaire d'un agent de réticulation ;

- l'article de Penchovsky et al. (Nucleic Acids Research, 28, 22, e98, 2000), qui décrit une méthode d'immobilisation d'oligonucléotides sur des billes de latex aminées, à l'aide d'un agent de réticulation qui réagit sous l'action de la lumière ; et

- les demandes internationales de brevet publiées sous les N° WO 99/16907, WO 00/40593 et WO 00/44939 de la société Surmodics (qui produit des lames pour le dépôt d'oligonucléotides fonctionnalisés avec une amine). Ces demandes décrivent notamment la fixation d'acides nucléiques sur des surfaces telles le verre, par l'intermédiaire d'un squelette polymérique auquel sont fixés un ou plusieurs groupements « photochimiquement actifs » d'un côté du polymère (pour le greffage sur la surface) et « thermochimiquement actifs » de l'autre côté (pour le greffage avec l'acide nucléique fonctionnalisé).

En ce qui concerne l'utilisation d'un poly(éthylène glycol) (PEG) hétérobifonctionnel, notons la demande de brevet internationale publiée sous le N° WO 95/13312 de la société Shearwater Polymers (devenue Nektar) qui mentionne l'utilisation thérapeutique d'un tel agent espaceur pour le greffage d'agents thérapeutiques sur des protéines.

Parmi les biopuces déjà réalisées ou en cours de réalisation, celles permettant à la fois de pouvoir être revêtues aussi bien de sondes nucléiques à séquences courtes (quelques dizaines de bases) simple brin, pouvant être synthétisées chimiquement, que de séquences beaucoup plus longues, double brin, comme celles issues de produits de PCR, allant de 200 à quelques milliers de paires de bases, font l'objet d'un grand intérêt.

En effet, pour les oligonucléotides de courte séquence, on ne peut pas utiliser par exemple les supports recouverts de polylysine, les acides nucléiques s'adsorbant à plat sur la polylysine et l'accès à la séquence lors de l'hybridation étant difficile voire impossible si le brin déposé est court. Il faut donc pouvoir greffer l'oligonucléotide court par une de ces extrémités afin de libérer l'accès à la séquence lors de l'hybridation ultérieure avec l'acide nucléique cible.

Il existe quelques supports commerciaux qui permettent ce greffage par liaison covalente. En général, les résultats obtenus avec ces biopuces ne sont pas totalement satisfaisants :

- le bruit de fond est trop important ;

- le signal d'hybridation est trop faible ;
- il y a présence de bavures (traînées de fluorescence autour des spots après hybridation) ;

5 - les propriétés de mouillage des surfaces ne sont pas satisfaisantes (les dépôts s'étalent jusqu'à se recouvrir d'un spot à l'autre, des hétérogénéités sous forme d'anneaux apparaissent) ce qui ne permet pas d'agir sur la densité de greffage ou d'obtenir lors du dépôt des spots de bonne taille (de diamètre moyen allant de 50 à 200 μm) ;

- l'absence d'un bras espaceur pour donner de la mobilité à la sonde greffée.

10 Pour cela, il serait souhaitable de pouvoir également disposer d'une biopuce dont le support permet après fixation de ne pas affecter la structure tertiaire (conformation tridimensionnelle) et de donner suffisamment de mobilité pour qu'une hybridation spécifique entre acides nucléiques simple brin puisse se réaliser.

15 Enfin, il serait souhaitable de pouvoir également disposer d'une biopuce dont le protocole permettant de réaliser l'immobilisation des sondes oligonucléotides sur un support, tel que du verre, en vue de la fabrication de ces biopuces soit un protocole simple (minimum d'étapes, si possible de chimie "légère"), rapide (ce point est d'autant plus important que les volumes utilisés sur chaque "spot" sont très faibles et s'évaporent rapidement, il est donc indispensable que le greffage covalent soit rapide et que les
20 sondes en excès puissent être facilement éliminées de la surface (sans laisser de traînées)) et reproductible.

Il apparaît au regard des biopuces testées et décrites dans les documents déjà publiés qu'aucune de ces biopuces ne correspond à ces critères.

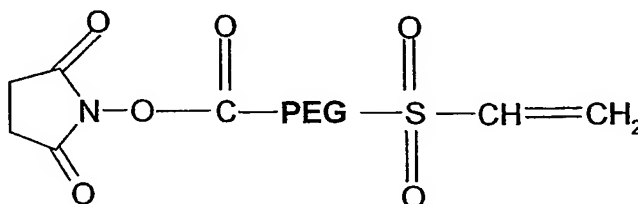
Ainsi, il reste de pouvoir disposer d'une biopuce présentant ces caractéristiques.

25 Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Les inventeurs ont de manière surprenante mis en évidence que l'utilisation d'un composé espaceur hétérobifonctionnel NHS-PEG-VS de formule (I) ci-après, fixé par liaison covalente sur un support solide préalablement fonctionnalisé, permettait d'obtenir des biopuces répondant à cette attente.

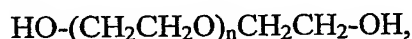
30 Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une biopuce activée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques, ladite biopuce

comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction thiol ou amine, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de fixation covalente dans les conditions appropriées sur ledit support fonctionnalisé d'un composé espaceur NHS-PEG-VS de formule (I) :



5

dans laquelle PEG désigne le poly(éthylène glycol) de formule



où n est un nombre entier choisi de telle sorte que la masse moléculaire du composé NHS-PEG-VS de formule (I) est comprise entre 500 et 5000, de préférence entre 2000 et 4000, de manière plus préférée voisine de 3400.

10

Par le terme « biopuce activée », on entend désigner dans la présente description, un support solide tel que défini ci-après, sur lequel auront été fixés par liaison covalente les composés espaceurs de formule (I) capables d'interagir avec les sondes nucléiques, mais non encore revêtu de cesdites sondes.

15

Par acide nucléique, sonde nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non

20

naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin, un PNA (pour « Peptid Nucleic Acid ») ou LNA (pour « Locked Nucleic Acid ») que des produits de transcription desdits ADNs tels que l'ARN.

Par sonde oligonucléotidique ou sonde nucléique, on entendra désigner ici l'oligonucléotide fonctionnalisé qui sera déposé (ou « spotté ») et fixé par liaison

25

covalente audit composé espaceur sur le support solide fonctionnalisé, ceci par opposition à l'acide nucléique cible issu de l'échantillon biologique que l'on cherche à détecter ou à identifier.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de préparation d'une biopuce activée selon l'invention est caractérisé en ce que ledit support solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon®, en Kevlar®, en silicone, en silicium, ou encore en polyoses ou poly(hétéro-oses), tel que la cellulose, de préférence en verre.

Ce support pourra être de forme quelconque (lame plane, microbilles, ...).

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, le procédé de préparation d'une biopuce activée selon l'invention est caractérisé en ce que ledit support solide en verre est fonctionnalisé par silanisation.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de préparation d'une biopuce activée selon l'invention est caractérisé en ce que ledit support solide est fonctionnalisé avec une fonction amine lorsque lesdites sondes oligonucléotidiques destinées à être fixées sont fonctionnalisées avec une fonction thiol terminale.

Lorsque ledit support solide, notamment en verre, est fonctionnalisé avec une fonction amine, on préfère réaliser cette fonctionnalisation en présence d'un aminosilane, de préférence le N-(2-aminoéthyl)-3-amino-propyltriméthoxysilane.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de préparation d'une biopuce activée selon l'invention est caractérisé en ce que ledit support solide est fonctionnalisé avec une fonction thiol lorsque lesdites sondes oligonucléotidiques destinées à être fixées sont fonctionnalisées avec une fonction amine terminale.

Lorsque ledit support solide, notamment en verre, est fonctionnalisé avec une fonction thiol, on préfère réaliser cette fonctionnalisation en présence de mercaptosilane, de préférence le (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une biopuce désactivée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec une fonction amine terminale caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'activation de la biopuce par un procédé de préparation d'une biopuce activée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec une fonction amine terminale; et

b) l'hydrolyse en présence d'une solution aqueuse, de préférence d'eau pure, des fonctions NHS libres des composés espaceurs NHS-PEG-VS de formule (I) fixés sur le support solide.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une
5 biopuce régénérée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec une fonction amine terminale, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- A) la désactivation la biopuce par le procédé ci-avant de préparation d'une biopuce désactivée selon l'invention ;
- 10 B) la régénération en présence de 1-éthyl-3[3(diméthylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) et de NHS des groupements carboxylates obtenus à l'extrémité libre desdits composés espaceurs après hydrolyse des fonctions NHS libres initialement présentes, et, le cas échéant,
- C) au moins une étape de lavage de la biopuce obtenue à l'étape B), de préférence en
15 eau déionisée.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de préparation d'une biopuce activée, désactivée ou régénérée selon l'invention, est caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle la biopuce obtenue est congelée, séchée ou lyophilisée, de préférence séchée sous atmosphère inerte, telle que sous azote, et à l'abri de l'humidité.

20 Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- α) la préparation d'une biopuce activée ou régénérée par un procédé selon l'invention ;
- β) le dépôt et la fixation par liaison covalente dans les conditions appropriées :
 - 25 - soit desdites sondes oligonucléotidiques préalablement fonctionnalisées avec une fonction thiol, si ledit support solide a été fonctionnalisé avec une fonction amine, ou
 - soit desdites sondes oligonucléotidiques préalablement fonctionnalisées avec une fonction amine, si ledit support solide a été fonctionnalisé avec une fonction thiol ;
- 30 et, le cas échéant,

- γ) l'élimination des sondes oligonucléotidiques non fixées sur le support par au moins une étape de rinçage du support dans des conditions appropriées, de préférence en eau déionisée.

La présente invention est en outre relative à un procédé de préparation d'une
5 biopuce comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction thiol, puis activé par dépôt de NHS-PEG-VS de formule (I) et revêtue de sondes oligonucléotidiques selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape suivante :

- δ) la désactivation en présence de composés aminés dans les conditions appropriées
10 des fonctions NHS du composé espaceur n'ayant pas interagi avec les fonctions amines des sondes oligonucléotidiques.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit composé permettant la désactivation des fonctions NHS du composé espaceur à l'étape δ) est choisi parmi les composés aminés possédant une amine primaire, de préférence l'éthanolamine ou le méthoxy-
15 PEG-NH₂, notamment tel que disponible pour ce dernier auprès de la société Shearwater Polymers (USA).

La présente invention est en outre relative à un procédé de préparation d'une biopuce comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction amine puis activé par dépôt de NHS-PEG-VS de formule (I) et revêtue de sondes
20 oligonucléotidiques, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape suivante :

- δ) la réduction, dans les conditions appropriées, des charges de surface en présence de composés anioniques ou susceptibles d'établir des liaisons covalentes avec les groupements amines et conduire à une espèce neutre ou négative dans les conditions appropriées, de préférence en présence de méthyl N-succinimidyl adipate
25 (MSA).

La présente invention est aussi relative à un procédé de préparation d'une biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle la biopuce obtenue est conservée à l'abri de l'humidité, de la lumière et/ou en atmosphère inerte.

- De préférence, lesdites sondes oligonucléotidiques sont des ADNs ou ARNs
30 monobrins, de préférence des ADNs ou des ARNs, dont la taille est comprise entre 15 et

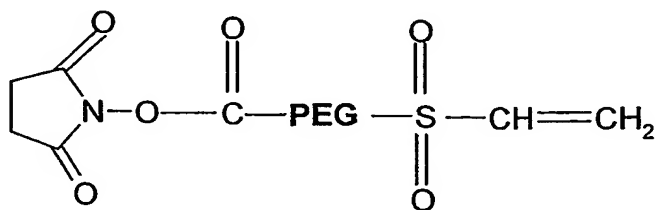
7 000 pb, de préférence entre 20 et 1 000 pb, entre 20 et 500 pb, entre 20 et 250 pb, entre 20 et 100 pb, entre 20 et 80 pb ou entre 35 et 80 pb.

Ces ADNs ou ARNs sondes peuvent être obtenus par synthèse chimique, ou à partir d'ADN génomique, d'ARN, ou d'ARNm, ou de leurs fragments, extrait de
5 cellules, notamment pour les ADNc après reverse transcription de ces ARNs, ou encore sous forme de fragment PCR obtenus par RT-PCR à partir de ces ARNs, ou par PCR à partir de ces ADNs génomiques (« RT-PCR » pour méthode dite de reverse transcription suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne).

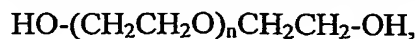
De préférence encore, les procédés de préparation d'une biopuce revêtue de
10 sondes oligonucléotidiques selon l'invention, sont caractérisés en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques sont déposées sous la forme de spots dont le diamètre moyen est compris entre 20 μm et 500 μm , de préférence entre 50 μm et 200 μm , et, le cas échéant, en ce que la distance moyenne entre le centre de chacun des spots de sondes oligonucléotidiques est comprise entre 80 μm et 400 μm .

15 De préférence encore, les procédés de préparation d'une biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques selon l'invention, sont caractérisés en ce que le nombre desdits spots de sondes oligonucléotidiques est compris entre 2 et 10^5 , de préférence entre 2 et 10^4 , 2 et 10^3 , 2 et $4 \cdot 10^2$, 2 et 10^2 , de manière encore plus préférée entre 50 et 10^3 et entre 50 et $4 \cdot 10^2$ par cm^2 .

20 Sous un nouvel aspect, la présente invention a pour objet une biopuce comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction thiol ou amine, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé espaceur NHS-PEG-VS de formule (I) :



25 dans laquelle PEG désigne le poly(éthylène glycol) de formule



où n est un nombre entier choisi de telle sorte que la masse moléculaire du composé NHS-PEG-VS de formule (I) est comprise entre 500 et 5000, de préférence comprise entre 200 et 4000 et voisin de 3400,

ledit composé espaceur étant fixé sur ledit support solide par une liaison covalente résultant soit de l'interaction entre la fonction thiol dudit support fonctionnalisé et la fonction vinylsulfone du composé espaceur de formule (I) ou soit de l'interaction entre la fonction amine dudit support fonctionnalisé et la fonction NHS du composé espaceur de formule (I).

De préférence, la biopuce selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins une sonde oligonucléotidique, préalablement fonctionnalisée avec une fonction thiol ou amine, fixée sur ledit support solide par une liaison covalente résultant soit de l'interaction entre la fonction NHS libre dudit composé espaceur de formule (I) et une fonction amine de ladite sonde oligonucléotidique, ou soit de l'interaction entre la fonction vinylsulfone libre du composé espaceur de formule (I) et une fonction thiol de ladite sonde oligonucléotidique.

De préférence également, la biopuce selon l'invention est caractérisée en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques fixées sont des ADNs ou ARNs monobrins, de préférence des ADNs ou des ARNs, dont la taille est comprise entre 15 et 7 000 pb, de préférence entre 20 et 1 000 pb, entre 20 et 500 pb, entre 20 et 250 pb, entre 20 et 100 pb, entre 20 et 80 pb ou entre 35 et 80 pb.

De préférence également, la biopuce selon l'invention est caractérisée en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques sont déposées sous la forme de spots dont le diamètre est compris entre 20 μm et 500 μm , de préférence entre 50 μm et 200 μm et, le cas échéant, en ce que la distance moyenne entre le centre de chacun des spots de sondes oligonucléotidiques est compris entre 80 μm et 400 μm .

De préférence également, la biopuce selon l'invention est caractérisée en ce que le nombre desdits spots de sondes oligonucléotidiques est compris entre 2 et 10^5 , de préférence entre 2 et 10^4 , 2 et 10^3 , 2 et $4 \cdot 10^2$, 2 et 10^2 , de manière encore plus préférée entre 50 et 10^3 et entre 50 et $4 \cdot 10^2$ par cm^2 .

De préférence également, la biopuce selon l'invention est caractérisée en ce que ledit support solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon®, en Kevlar®, en silicone, en silicium, en polyoses ou polyhétéro-oses, de préférence en verre, de préférence silanisé.

5 La présente invention a aussi pour objet une biopuce activée, désactivée, régénérée, ou encore revêtue de sondes oligonucléotidiques, susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention.

Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation d'une biopuce selon l'invention pour la détection d'acides nucléiques dans un échantillon.

10 Sous encore un autre aspect, la présente invention est relative à un kit ou nécessaire pour la détection, l'analyse qualitative ou quantitative d'acides nucléiques dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend une biopuce selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé pour la détection d'acides nucléiques dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes
15 suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant les acides nucléiques cibles dont on cherche à détecter la présence sur une biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques selon l'invention, dans des conditions permettant l'hybridation spécifique de ces acides nucléiques cibles avec lesdites sondes oligonucléotidiques;

20 b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions appropriées afin d'éliminer les acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

c) la détection des acides nucléiques capturés sur la biopuce par hybridation.

Par conditions permettant l'hybridation spécifique d'acides nucléiques cibles
25 avec lesdites sondes oligonucléotidiques, il s'agit de préférence de conditions de forte stringence notamment telles que définies ci-après ou telles que citées, sans s'y limiter, dans les exemples ci-après.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles
30 permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN ou d'ARN/ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape

d'hybridation aux fins de définir les conditions d'hybridation décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

L'invention comprend également un procédé pour la détection d'acides nucléiques dans un échantillon selon l'invention, caractérisé en ce que les acides nucléiques dont on cherche à détecter la présence sont préalablement marqués à une de leur extrémité par un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable, de préférence détectable par fluorescence.

L'invention comprend également un procédé pour la détection d'acides nucléiques selon la présente invention, caractérisé en ce que les acides nucléiques dont on cherche à détecter la présence sont préalablement marqués pour au moins deux d'entre eux par un marqueur différent.

De préférence, lesdits marqueurs sont choisis parmi des dérivés de la cyanine, de préférence choisis parmi les dérivés sulfonates de la cyanine, notamment les composés Cy5 ou Cy3, les nanocristaux (Migyong Han et al, Nature Biotechnology, 19, 631-635, 2001) ou les nanoparticules (société Genicon Science).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une biopuce selon l'invention comme matrice d'affinité ou pour la purification d'acide nucléique.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une biopuce selon l'invention pour le séquençage d'acide nucléique, pour l'analyse qualitative ou quantitative de l'expression de gènes ou encore pour l'étude et la détection de polymorphismes génétiques (aussi appelés SNP's pour « Single Nucleotide Polymorphism » ou SNIPS).

Par exemple, mais sans s'y limiter, on dépose sur les biopuces selon l'invention des sondes d'ADN correspondant à des gènes connus. Chaque dépôt ou spot pourra contenir plusieurs milliers de sondes oligonucléotidiques correspondant à un même gène et d'un spot à l'autre les sondes oligonucléotidiques correspondront à un autre gène, ou à un gène présentant un polymorphisme différent.

Les ADNs génomiques, ou ARN messagers, ou leurs fragments, du tissu ou de la cellule que l'on souhaite étudier pourront être extraits puis marqués avec des fluorochromes (les ADNs ou ARNm pourront notamment être transformés en ADN complémentaires (ADNc) par réverse transcription, et, le cas échéant, multipliés par les techniques de PCR ou RT-PCR).

Ces ADNs, ADNc, ou ARNs seront ensuite déposés sur la biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques et, le cas échéant, se lier par hybridation spécifique avec les sondes oligonucléotidiques préalablement déposées qui leur correspondent. On va ensuite détecter sur chaque spot, la quantité de signal, notamment de fluorescence, correspondant ainsi à la quantité d'acides nucléiques cibles hybridés, qui sera notamment proportionnelle à la quantité initiale d'ARNm extraits, si les ADNs cibles déposés sont des ADNc complémentaires d'ARNm transcrits. On pourra ainsi mesurer l'activité de transcription de la cellule pour certains gènes.

Les applications de ces biopuces à ADN sont par conséquent nombreuses, telles que les études de la transcription, le diagnostic (recherche de mutation), recherche de cibles thérapeutiques, cartographie génétique des individus.

On pourra notamment se référer pour les applications générales de ces biopuces aux nombreux documents déjà publiés sur ce sujet, documents dans lesquels les méthodes mises en œuvres pour ces applications à partir de biopuces activées, ou régénérées, comme celles de la présente invention sont parfaitement explicitées.

Sous encore un autre aspect, l'invention, est relative à une méthode de criblage de composés ou cellules capables de se fixer spécifiquement sur un oligonucléotide donné, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé à tester sur une biopuce selon l'invention, dans les conditions permettant la fixation spécifique éventuelle dudit composé ou de ladite cellule à tester avec ledit oligonucléotide donné, ladite biopuce comprenant au moins un spot de sondes oligonucléotidiques contenant lesdits oligonucléotides donnés fixés sur son support solide et, le cas échéant, ledit composé ou ladite cellule étant marqué par un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable ;

b) l'élimination par au moins une étape de lavage dans les conditions appropriées des composés ou cellules à tester non fixés spécifiquement sur ledit oligonucléotide donné ; et

c) la sélection du composé ou de ladite cellule spécifiquement fixé sur ledit oligonucléotide donné, le cas échéant, par la sélection du composé ou de ladite cellule dont le signal a été détecté au niveau du spot contenant ledit oligonucléotide donné.

Sous enfin un dernier aspect, la présente invention a pour objet un instrument ou dispositif de diagnostic ou de recherche comprenant une biopuce selon l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

LEGENDES DES FIGURES

Figures 1A à 1D : Greffage d'oligonucléotides fonctionnalisés par un groupement aminé (NH₂-terminés)

Figure 1A : surface de verre (silanols Si-OH).

Figure 1B : surface de verre fonctionnalisée avec des mercapto-silanes (SH-terminés).

Figure 1C : greffage de PEG hétérobifonctionnel (NHS-PEG-VS). Les extrémités NHS restent libres et réactives;

Figure 1D : fixation d'oligonucléotides fonctionnalisés par un groupement aminé (NH₂-terminés).

Exemple 1. Support pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées par un groupement amine : Méthode 1

1. Principe

Utilisation d'un PEG hétérobifonctionnel portant les fonctions NHS et VS.

La surface est dans un premier temps silanisée (fonctionnalisation) de façon à obtenir des fonctions SH (thiol en surface). La fonction VS du PEG hétérobifonctionnel qui est ensuite déposé (activation) va réagir avec les thiols de la surface pour former une liaison covalente. Les oligonucléotides portant une fonction amine à l'une de leurs extrémités sont finalement déposés. Cette fonction amine va réagir avec la fonction NHS du PEG hétérobifonctionnel pour former une liaison covalente.

2. Protocole expérimental

a) Silanisation

Des lames de verre GOLD SEAL sont utilisées. Ces lames sont nettoyées à l'aide d'un mélange d'acide sulfurique-eau oxygénée (70/30, v/v) d'un volume de 300 ml pendant 15 minutes (mélange Piranha).

Les lames sont rincées à l'eau pure puis au méthanol.

Le bain de silanisation est composé de :

- 60 ml de méthanol pur pour synthèse (SDS réf.: 0930221) ;
- 510 µl d'acide acétique ;
- 2,55 ml d'eau pure ; et
- 1,275 ml de (3-Mercaptopropyl)-triméthoxysilane (SIGMA, EE No. 224-588-

5).

Les lames sont plongées 2 heures dans ce bain.

Les lames sont ensuite rincées au méthanol pur puis séchées à l'argon, enfin les lames sont placées 15 minutes dans une étuve à 94°C.

Les lames sont stockées sous vide dans un dessiccateur.

b) Application du PEG hétérobifonctionnel

Préparation d'une solution de PEG hétérobifonctionnel dans du tampon PBS 1x (phosphate salin) à pH 7. Cette valeur de pH est optimale pour la réaction entre les thiols de la surface et la fonction VS du PEG.

Pour une lame :

- 5 - 2 mg de NHS-PEG-VS, MW 3400 (Shearwater Polymers) ; et
- 2 ml de PBS 1x.

La solution est déposée sur la surface de la lame à traiter pendant 45 minutes.

Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau déionisée et séchées à l'argon.

Exemple 2. Support pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées par
10 **un groupement thiol : Méthode 2**

1. Principe

C'est le même principe que pour la méthode 1 sauf qu'ici la surface des lames est silanisée avec des fonctions amines. Ainsi, la fonction NHS du PEG va réagir avec ces groupements de surface et le groupement VS restant pourra réagir avec des
15 oligonucléotides possédant une fonction thiol terminale.

2. Protocole expérimental

a) Silanisation

Les lames sont, comme pour le protocole expérimental de l'exemple 1, lavées avec le mélange Piranha.

20 La composition du bain de silanisation change :

- 60 ml de méthanol pur pour synthèse (SDS réf.: 0930221) ;
- 510 µl d'acide acétique ;
- 2,55 ml d'eau pure ;
- 1,275 ml de Silane : N-[3-(Triméthoxysilyl)propyl]diéthylènetriamine, 97 %
25 (ALDRICH 10,488-4).

La solution est déposée sur la surface de la lame à traiter pendant 45 minutes.

Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau déionisée et séchées à l'argon.

b) Application du PEG hétérobifonctionnel

Composition de la solution (pour une lame) :

- 30 - 2 mg de NHS –PEG –VS MW 3400 Shearwater Polymers ;
- 2 ml de tampon Carbonate-Bicarbonate (CB), pH 8,4.

Le pH de 8,4 est optimal pour la réaction chimique entre la fonction NHS du PEG et les fonctions NH₂ de la surface silanisée.

La solution est déposée sur la surface de la lame à traiter pendant 45 minutes.

Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau déionisée et séchées à l'Argon.

5 **Exemple 3. Support désactivé puis régénéré pour sondes oligonucléotidiques ou peptidiques fonctionnalisées par un groupement amine**

1. Principe

La fonction NHS est sensible à l'humidité et se désactive en quelques jours. Pour remédier à cela, il a été mis au point une méthode qui consiste à désactiver la fonction
10 sous une forme stable puis à la régénérer au moment du dépôt des sondes oligonucléotidiques.

2. Protocole expérimental

a) Désactivation

Les lames sont d'abord préparées comme pour la méthode 1. Puis on hydrolyse
15 la fonction NHS en plongeant les lames dans un bain d'eau pure jusqu'au moment de la désactivation. La fonction NHS se transforme en carboxylate (COO⁻).

b) Régénération

Le protocole de Patel et al. (Langmuir, 13:06485-6490, 1997) est appliqué ici. Brièvement :

20 On prépare dans de l'eau pure une solution composée de :
 - 15 mM de NHS (Fluka), de préférence dissous préalablement dans du DMSO (on peut également utiliser du sulfo-NHS à la place du NHS qui est soluble dans l'eau) ;
 et
 - 5 mM d'EDC.

25 Les lames sont ensuite plongées dans la solution pendant 10 minutes.

On rince ensuite les lames à l'eau pure et on les sèche à l'argon.

Exemple 4. Passivation (ou « capping ») des régions du support présentant des groupements NHS actifs du composé espaceur n'ayant pas interagi avec les sondes pour la méthode 1

30 **1. Principe**

Après le dépôt des oligonucléotides (« spotting »), les régions autour de ces dépôts possèdent toujours des groupements actifs de type NHS ou VS suivant la méthode utilisée. Cela est en particulier gênant pour la méthode 1 telle que décrite dans l'exemple 1 pour laquelle le groupement actif NHS est réactif avec les groupements amines. Or, ces groupements amines se retrouvent dans certaines bases nucléotidiques. Ces groupements amines sont, notamment pour les bases, beaucoup moins réactifs que les groupements amines primaires qui servent de fonction d'accroche pour les oligonucléotides. Ainsi, lors du dépôt, les amines des bases n'entrent pas en compétition (ou très peu) avec les amines terminales des sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées. Par contre, lors de l'hybridation, les acides nucléiques cibles, tels que les ADNc, que l'on dépose sur le support ne possèdent que les amines constitutives de leurs bases. Il risque donc d'y avoir une réaction entre les amines des bases des acides nucléiques cibles et les NHS restant autour des dépôts des sondes oligonucléotidiques ce qui a pour conséquence d'augmenter le bruit de fond. Il est donc préférable de désactiver ces sites NHS encore actifs.

2. Protocole de passivation des supports pour la méthode 1 telle que décrite dans l'exemple 1

2.1 Protocole 1 utilisant de l'éthanolamine comme agent de désactivation des groupements NHS n'ayant pas interagi avec les sondes.

20 Solution de capping :

- 40 ml de tampon phosphate ($\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$) pH = 8,2 150mM ;
- 1 ml d'éthanolamine ;
- 2 ml de SDS 10 % ; et
- on complète avec de l'eau milliQ jusqu'à 200 ml.

25 Solution de lavage :

- 100 ml 20 X SSC ;
- 5 ml SDS 10 % ; et
- on complète à 500 ml avec de l'eau milliQ.

Les lames sont placées pendant 15 min dans la solution de blocage à 50°C :

- 30**
- rinçage à l'eau milliQ pendant 4 min ;
 - lavage des lames avec la solution de lavage pendant 15 min ;

- rinçage à l'eau milliQ pendant 6 min ; et
- centrifugation à 800 tr/min (50 g) pendant 3 min.

2.2 Protocole 2 utilisant un PEG monofonctionnel comme agent de désactivation des groupements NHS n'ayant pas interagi avec les sondes.

- 5 Pour ce deuxième protocole un PEG monofonctionnel possédant un groupement amine à l'une de ses extrémités est utilisé. Ce groupement aminé réagit avec les NHS en formant une liaison covalente. La surface autour des spots sur lesquels ont été déposées les sondes est alors recouverte de PEG.

On prépare une solution contenant :

- 10
- 2 ml de tampon phosphate ($\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$) 150 mM à pH 8,2 ; et
 - 2 mg de méthoxy-PEG-NH₂ (Shearwater Polymers).

La lame est plongée dans cette solution pendant 45 minutes, puis elle est rincée à l'eau pure et séchée à l'argon.

- 15 **Exemple 5. Passivation des régions du support présentant des groupements VS actifs du composé espaceur n'ayant pas interagi avec les sondes pour la méthode 2**

- Comme il n'y a pas de fonction thiol dans les bases constitutives des acides nucléiques, tel que l'ADN, il n'est donc pas nécessaire de désactiver les sites VS libres pour le dépôt de sondes oligonucléotidiques. Seul un rinçage à l'eau pure est réalisé afin
- 20 d'éliminer ici les oligonucléotides qui ne se sont pas greffés.

De manière générale, tous les composés thiolés et par exemple le N-éthylmaléimide, les dérivés iodoacétates (sodium tétrathionate, réactif d'Ellman), les aziridines, les dérivés acryloyles, peuvent être utilisés.

- Toutefois, afin d'isoler ou de réduire les charges de surfaces dans la méthode 2,
- 25 il est préférable de déposer avant spotting des sondes, dans les conditions appropriées, des composés anioniques ou susceptibles d'établir des liaisons covalentes avec les groupements amines et conduire à une espèce neutre ou négative dans les conditions appropriées, tel que par exemple suivant le protocole ci-après en utilisant le méthyl N-succinimidyl adipate (MSA).

- 30 Protocole utilisant le MSA comme agent de neutralisation des charges de surfaces dans la méthode 2.

On dépose sur la surface une solution de MSA dans du PBS 1 x pH 7,4 (1 mg de MSA pour 1 ml de PBS). La surface est recouverte d'une lame de plastique. La solution de MSA est laissée en contact avec la surface pendant 1 heure. Ensuite rinçage à l'eau pure et séchage à l'azote.

5 **Exemple 6. Expériences d'hybridation des lames avec une solution de sondes oligonucléotidiques : influence du pH sur le greffage des oligonucléotides**

1. Principe des expériences

Des sondes oligonucléotidiques de 50 bases correspondant à des fragments de gènes de souris ont été déposées sur des lames de verre fonctionnalisées sur lesquelles le
10 composé espaceur NHS-PEG-VS a été préalablement fixé. Trois séquences nucléiques ont été utilisées :

GTGCCTCACGGTGGTTGCCATCACTGTCTTCATGTTTCGAGTATTTTCAGCC
(SEQ ID N° 1) ;

TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACGCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG
15 (SEQ ID N° 2) ; et

AACGCCCATCTTAAAATCGACGCCTGTCTCTCCCCATTGCTCTTACCAG
(SEQ ID N° 3).

Pour chaque séquence sonde, trois types d'oligonucléotides ont été déposés :

- fonctionnalisé NH₂ en 3' ;
- 20 - fonctionnalisé SH en 3' ; et
- non fonctionnalisé.

Les lames ainsi obtenues ont été comparées aux lames de différentes sociétés.

2. Matériel

Les oligonucléotides sont déposés à l'aide d'un « spotteur » de la société
25 GeneMachines (OmniGrid). Ce spotteur est un spotteur à pointe (Majer Precision) qui permet de faire des dépôts de quelques nl. Entre chaque dépôt la pointe est lavée afin d'éviter les contaminations d'un dépôt à l'autre.

Les lames sont ensuite lues après hybridation à l'aide d'un scanner (ScanArray 3000 GSI) et les images sont analysées à l'aide du logiciel Imogene 4.1 (Biodiscovery).

30 **3. Expériences d'hybridation d'oligonucléotides sur les lames pour oligonucléotides aminés**

a) Préparation des lames

Les lames selon la présente invention sont préparées selon la méthode 1 et la méthode 2. Les résultats obtenus avec ces lames ont été comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions d'utilisation avec des lames commercialisées par la Société
5 SurModics (SurModics, Inc., Eden Prairie, MN) sous la référence « 3D-LINK™ activated slides » (Lot DN01B058 paquet N° 19), lames activées capables de fixer des sondes nucléotidiques fonctionnalisées NH₂ possédant une fonction amine libre (« amine-binding slides »). Les lames de la Société SurModics sont connues comme étant les plus performantes des lames commerciales actuellement disponibles. Pour la
10 comparaison de méthodes chimiques permettant d'immobiliser de manière covalente des oligonucléotides sur des lames de verre, on pourra par exemple se référer à l'article de Lindroos et al. (Nucleic Acids Research, 29, 13, e69, 2001) qui compare 8 méthodes différentes, dont un certain nombre de lames commercialisées.

Trois séquences sondes d'oligonucléotides et pour chacune de ces séquences
15 sondes trois types d'oligonucléotides modifiés (fonctionnalisé NH₂, fonctionnalisé SH, non fonctionnalisé) ont été déposés, chaque solution d'oligonucléotides pour différentes valeurs de pH (6,8 ; 7,7 ; et 8,3). Chaque échantillon est spotté deux fois. Ainsi, sur chaque lame, $3 \times 3 \times 3 \times 2 = 54$ spots d'oligonucléotides sont déposés.

Cette matrice de spots a été déposée deux fois sur la lame.

20 De plus entre chaque oligonucléotide un double dépôt de tampon est réalisé afin d'éliminer tout risque de contamination.

b) Préparation des oligonucléotides

Les oligonucléotides sont resuspendus dans de l'eau pure (milliQ) à la concentration de 0,5 mM.

25 La concentration des solutions d'oligonucléotides est ajustée à 5 µM pour les valeurs de pH 6,8 ; 7,7 ; et 8,3 en tampon phosphate 150 mM, dans un volume total de 12 µl.

c) Préparation de la solution d'hybridation d'oligonucléotides

Les biopuces ainsi revêtues de sondes oligonucléotidiques sont hybridées avec
30 une solution contenant les oligonucléotides cibles de séquences complémentaires des sondes oligonucléotidiques déposées.

Trois oligonucléotides cibles de séquences complémentaires des sondes oligonucléotidiques ainsi spottées ont été mélangés :

GGCTGAAATACTCGAACATGAAGACAGTGATGGCAACCACCGTGAGGCAC
(SEQ ID N° 4) ;

5 CTTCCAGGTAACCACTTCCGTCAGCGTCGAAATGAAGCCAGATCTCAAAA
(SEQ ID N° 5) ; et

CTGGTAAGAGCAATGGGGGAGAGACAGGCGTCGATTTTAAGATGGGCGTT
(SEQ ID N° 6).

Ces oligonucléotides cibles portent un fluorochrome (Cy5) en 5'.

10 Ces oligonucléotides cibles complémentaires sont d'abord resuspendus dans de l'eau pure à la concentration de 50 μ M.

Puis le mélange suivant est préparé :

- 497 μ l d'eau pure ; et

- 1 μ l de chaque oligonucléotide cible complémentaire (soit au total 3 μ l).

15 On obtient un mélange des trois oligonucléotides cibles portant un fluorochrome (Cy5) en 5' à la concentration de 0,1 μ M pour chacun de ces oligonucléotides cibles.

On prépare ensuite la solution d'hybridation :

- 1 μ l de la solution d'oligonucléotides cibles complémentaires à 0,1 μ M pour chacun ;

20 - 15,8 μ l d'eau pure ;

- 3,6 μ l de 20 X SSC (pH 7) ; et

- 0,6 μ l de SDS 10 %,

soit une solution à la concentration de 5 nM par oligonucléotide cible complémentaire.

d) Hybridation

25 Les biopuces revêtues de sondes oligonucléotidiques sont hybridées avec la solution d'oligonucléotides cibles complémentaires décrite précédemment.

On dépose 12 μ l de solution oligonucléotides cibles sur chaque biopuce. On recouvre d'une lamelle plastique et les biopuces sont placées dans une chambre d'hybridation (GeneMachines).

30 La chambre est maintenue dans un bain marie à 60°C pendant une nuit.

e) Rinçage

Solution 1 :

- 50 ml 20X SSC ;
- 5 ml SDS 10 % ; et
- qsp 500 ml d'eau milliQ.

5 Solution 2 :

- 5 ml 20X SSC ; et
- qsp 500 ml d'eau milliQ.

Solution 3 :

- 2,5 ml 20X SSC ; et
- 10 - qsp 500 ml d'eau milliQ.

Après hybridation, les lames sont rincées comme ci-après.

Les lames sont d'abord placées dans une solution 4X SSC afin de faire tomber les lamelles, puis :

- rinçage pendant 2 x 5 min dans la solution 1 ;
- 15 - rinçage 1 min dans la solution 2 ; et
- rinçage 1 min dans la solution 3.

4. Résultats des expériences d'hybridation

4.1 Réglage du scanner

Le scanner utilisé possède deux réglages pour la lecture :

- 20 - le réglage de l'intensité d'excitation (LASER) ; et
- le réglage de la puissance du photomultiplicateur (PMT, servant à la mesure d'intensité de fluorescence).

L'intensité de ces deux réglages s'exprime dans une unité arbitraire. Au maximum les deux valeurs sont à 100.

25 Pour certaines lames ces valeurs maximales saturant le signal de fluorescence, il faut alors diminuer les intensités du LASER et/ou du PMT.

4.2 Lames pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement aminé : Méthode 1

30 Pour un réglage LASER/PMT à 100/100, le signal obtenu est saturé pour tous les spots d'oligonucléotides sondes déposés (signal supérieur à 65 000). Ces réglages ont été ainsi diminués à 75/68.

Les résultats des expériences sont donnés dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU 1

	Intensité moyenne de fluorescence	Bruit de fond autour du spot	Rapport signal/bruit	Diamètre moyen (µm) n=6	Ecart type des diamètres n=6
oligo NH ₂ pH=6,8	18900 +/- 6550	6,4 +/- 0,5	3000 +/- 1000	96	10
oligo NH ₂ pH=7,7	22400 +/- 5700	7 +/- 0,45	3200 +/- 800	105	4
oligo NH ₂ pH=8,3	34500 +/- 1600	6,7 +/- 0,6	5200 +/- 450	103	3
oligo non fonctionnalisé pH=6,8	4300 +/- 1500	5,6 +/- 0,2	800 +/- 250	93	7
oligo non fonctionnalisé pH=7,7	6500 +/- 1900	6,0 +/- 0,4	1000 +/- 1100	93	7,5
oligo non fonctionnalisé pH=8,3	8000 +/- 2600	6,0 +/- 0,2	1300 +/- 400	101	8,5

5

Légende du Tableau 1 : Expérience d'hybridation sur une biopuce préparée selon la méthode 1: test de pH.

Des sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées NH₂ (« oligo NH₂ ») et non
 10 fonctionnalisées ont été déposées à différentes valeurs de pH. La puce a été hybridée
 avec un mélange d'oligonucléotides cibles complémentaires de ceux déposés, marqués
 en fluorescence. 2 matrices de 54 spots ont été déposées.

Les rapports des intensités de fluorescence obtenues pour les sondes
 oligonucléotidiques fonctionnalisées et non fonctionnalisées montrent la très bonne
 15 sélectivité du support pour les sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées qui se
 greffent par liaison covalente.

Le rapport signal sur bruit est excellent (5 000), le bruit de fond étant très faible.

Les spots sont de très bonne taille avec une très faible dispersion des diamètres (faible mouillabilité) surtout pour les sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec des groupements aminés.

Enfin, la réaction de greffage est particulièrement efficace à pH basique (8,3).

5 4.3 Lames pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement thiol : Méthode 2

Le scanner a été réglé sur 100/100. Les résultats de l'expérience sont présentés dans le tableau 2 ci-après.

10 TABLEAU 2

	Intensité moyenne de fluorescence	Bruit de fond autour du spot	Rapport signal/bruit	Diamètre moyen (µm) n=6	Ecart type des diamètres n=6
oligo SH pH=6,8	60600	500	120	155	5,5
oligo SH pH=7,7	62700	525	120	157	8
oligo SH pH=8,3	61300	463	130	157	10
oligo non fonctionnalisé pH=6,8	36500	390	94	160	11
oligo non fonctionnalisé pH=7,7	44000	470	94	156	10
oligo non fonctionnalisé pH=8,3	50500	425	120	160	10

Légende du Tableau 2 : Expérience d'hybridation sur une puce préparée d'après la méthode 2 : test de pH

15

Des sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement SH (« Oligo SH ») et non fonctionnalisées (« Oligo non fonctionnalisé ») ont été déposées en solution à différentes valeurs de pH. La puce a été hybridée avec un mélange des oligonucléotides cibles complémentaires des sondes déposées, marqués en fluorescence.

Les sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement SH se fixent mieux que les sondes oligonucléotidiques non fonctionnalisées mais la sélectivité du support est moins forte que pour les lames obtenues avec la méthode 1. Le pH influence assez peu le greffage.

5 Le rapport signal sur bruit est assez bon.

4.4 Lames obtenues auprès du fournisseur Surmodics pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement aminé

Le réglage du scanner est 100/100.

Résultats : voir tableau 3 ci-après.

10

TABLEAU 3

	Intensité moyenne de fluorescence	Bruit de fond autour du spot	Rapport signal/bruit	Diamètre moyen (µm)	Ecart type des diamètres
oligo NH2 pH=6,8	19000 +/- 13500	60 +/- 10	310 +/- 175	133	10
oligo NH2 pH=7,7	44000 +/- 10500	65 +/- 10	700 +/- 200	127	10
oligo NH2 pH=8,3	50000 +/- 11600	70 +/- 10	700 +/- 150	125	8,5
oligo non fonctionnalisé pH=6,8	6400 +/- 7200	80 +/- 40	80 +/- 160	182	79
oligo non fonctionnalisé pH=7,7	7500 +/- 9000	80 +/- 50	75 +/- 70	160	40
oligo non fonctionnalisé pH=8,3	7300 +/- 9300	50 +/- 15	30 +/- 130	215	74

Légende du Tableau 3 : Expérience d'hybridation sur une biopuce spottée sur une lame

15 Surmodics : test de pH

Des sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement aminé (« Oligo NH2 ») et non fonctionnalisées (« Oligo non fonctionnalisé ») ont été déposées en solution à différentes valeurs de pH. La biopuce a été hybridée avec un mélange

d'oligonucléotides cibles complémentaires des sondes déposées, marqués en fluorescence.

L'intensité de la fluorescence est faible comparativement aux intensités mesurées sur les lames selon la présente invention, d'autant plus que les réglages du scanner sont très différents pour les deux expériences.

La sélectivité du support vis-à-vis des sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement aminé apparaît bonne, les sondes oligonucléotidiques non fonctionnalisées se fixent peu.

Le greffage semble plus efficace en milieu basique (pH 8,3).

Le rapport signal sur bruit apparaît acceptable mais bien moins important que pour les lames selon l'invention obtenues par la méthode 1 (7 fois moins). C'est l'intérêt d'avoir un bon signal de fluorescence qui permet de diminuer l'intensité du LASER d'excitation et de la détection et ainsi de diminuer le bruit de fond.

Enfin, les diamètres des spots sont assez larges (mouillabilité plus importante des lames « SURMODICS » que celle des lames selon la présente invention).

Une faible mouillabilité permet non seulement d'avoir une meilleure définition des spots mais également de réduire la distance moyenne entre deux spots, ce qui permet en particulier d'augmenter le nombre de spots de sondes déposés par cm^2 .

Exemple 7. Expériences d'hybridation des lames avec une solution de sondes oligonucléotidiques : influence de la concentration des oligonucléotides

1. Principe des expériences

Dans cette expérience, les mêmes séquences que pour l'exemple 6 sont utilisées. Dans ces expériences, on fait varier la concentration de ces séquences lors du dépôt.

2. Matériel

Le même matériel que celui indiqué dans l'exemple 6 est utilisé.

3. Expérience d'hybridation d'oligonucléotides sur les lames pour oligonucléotides aminés

a) Préparation des lames

Les lames sont préparées selon la méthode 1 et comparées aux lames Surmodics. Trois séquences d'oligonucléotides (les mêmes que pour l'exemple 6) et pour chaque séquence deux types d'oligonucléotides modifiés (fonctionnalisé NH_2 et non

fonctionnalisés) sont déposés. Chaque oligonucléotide est déposé pour 5 valeurs de concentration (2 ; 5 ; 10 ; 20 ; et 40 μM). Chaque échantillon est spotté deux fois. Ainsi, sur chaque lame, 2 matrices de $2 \times 3 \times 5 \times 2 = 45$ spots d'oligonucléotides auront été déposées.

- 5 De plus, entre chaque oligonucléotide un double dépôt de tampon est effectué afin d'éliminer tout risque de contamination.

b) Préparation des oligonucléotides

Le pH des solutions à déposer est fixé à 8,2 à l'aide de tampon phosphate 150 mM.

- 10 La concentration des oligonucléotides sondes est ajustée pour les 5 valeurs en complétant le mélange avec de l'eau milliQ.

c) Préparation de la solution d'hybridation

Même solution et même protocole que pour l'exemple 6.

d) Hybridation

- 15 Même protocole que pour l'exemple 6.

4. Résultats des expériences

4.1 Lames pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement aminé : Méthode 1

Le réglage du scanner est à 90/95.

- 20 Les résultats des expériences sont donnés dans le tableau 4 ci-après.

4.2 Lames obtenues auprès du fournisseur Surmodics pour sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec un groupement aminé

Le réglage du scanner est à 90/95. Les résultats d'expérience sont donnés dans le tableau 5 ci-après.

5

TABLEAU 5

	Intensité moyenne de fluorescence	Bruit de fond autour des spots	Rapport signal/bruit	Diamètre moyen (µm)	Ecart type des diamètres
oligo NH ₂ à 40 µM	7200 +/- 2800	30 +/- 8	265 +/- 100	171	7
oligo NH ₂ à 20 µM	4000 +/- 1500	25 +/- 7	170 +/- 70	158	7
oligo NH ₂ à 10 µM	2700 +/- 1000	22 +/- 3	125 +/- 60	160	8
oligo NH ₂ à 5 µM	1800 +/- 800	23 +/- 6	80 +/- 40	155	5
oligo NH ₂ à 2 µM	1100 +/- 500	21 +/- 1	50 +/- 20	152	4
oligo à 40 µM	1000 +/- 250	22 +/- 3	50 +/- 10	160	10
oligo à 20 µM	500 +/- 130	21 +/- 3	25 +/- 8	158	7
oligo à 10 µM	200 +/- 70	26 +/- 7	8 +/- 3	158	9
oligo à 5 µM	100 +/- 25	21 +/- 3	5 +/- 1	157	7,5
oligo à 2 µM	50 +/- 10	22 +/- 4	2,5 +/- 0,5	155	7,6

Légende du Tableau 5 : Expérience d'hybridation sur une biopuce spottée sur une lame

10 Surmodics : test de concentration.

Les intensités sont plus faibles que pour les lames de la méthode 1.

Le meilleur rapport signal sur bruit est obtenu pour la plus forte concentration et vaut 265.

15 Comparées avec les lames selon l'invention, les lames Surmodics présentent un signal de fluorescence 4 fois supérieur (31000 contre 7200) et un rapport signal sur bruit 5 fois supérieur pour une concentration en oligonucléotides 8 fois inférieure (5 µM).

Ainsi, les lames selon l'invention permettent d'utiliser moins d'oligonucléotides que les lames Surmodics pour une intensité de signal supérieure.

La taille des spots les lames Surmodics est plus large que pour les lames selon l'invention avec une distribution assez étroite.

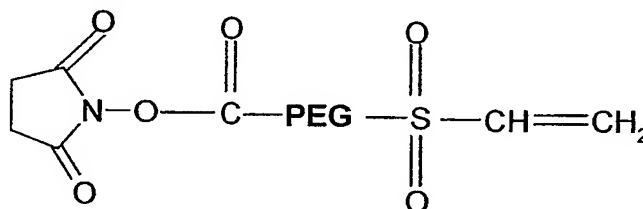
Les biopuces obtenues par les procédés de préparation selon l'invention, notamment selon la méthode 1, s'avèrent particulièrement performantes par rapport aux
5 autres supports commerciaux, notamment par rapport aux supports de type « Surmodics » qui font référence en la matière.

Finalement, les expériences réalisées avec les lames obtenues par les procédés selon la présente invention, notamment selon la méthode 1, mettent en évidence :

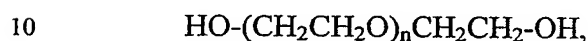
- un greffage très efficace (le signal d'hybridation est très fort),
- 10 - un bruit de fond très faible,
- des propriétés de mouillage excellentes (les spots sont homogènes et réguliers),
- l'utilisation de moins d'oligonucléotides sondes que pour les lames Surmodics.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une biopuce activée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques, ladite biopuce comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction thiol ou amine, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de fixation covalente dans les conditions appropriées sur ledit support fonctionnalisé d'un composé espaceur NHS-PEG-VS de formule (I) :



dans laquelle PEG désigne le poly(éthylène glycol) de formule



où n est un nombre entier choisi de telle sorte que la masse moléculaire du composé NHS-PEG-VS de formule (I) est comprise entre 500 et 5000, de préférence entre 200 et 4000, de manière plus préférée voisine de 3400,

ledit composé espaceur étant fixé sur ledit support solide par une liaison covalente résultant soit de l'interaction entre la fonction thiol dudit support fonctionnalisé et la fonction VS (vinylsulfone) du composé espaceur de formule (I), ou soit de l'interaction entre la fonction amine dudit support fonctionnalisé et la fonction NHS (N-hydroxysuccinimide) du composé espaceur de formule (I).

2. Procédé de préparation d'une biopuce activée selon la revendication 1, caractérisé en ce que la masse moléculaire du composé NHS-PEG-VS de formule (I) est voisine de 3400.

3. Procédé de préparation d'une biopuce activée selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit support solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon[®], en Kevlar[®], en silicone, en silicium ou en polyoses, de préférence en verre.

4. Procédé de préparation d'une biopuce selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit support solide en verre est fonctionnalisé par silanisation.

5. Procédé de préparation d'une biopuce activée selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit support solide est fonctionnalisé avec une fonction amine lorsque lesdites sondes oligonucléotidiques destinées à être fixées sont fonctionnalisées avec une fonction thiol terminale.

5 6. Procédé de préparation d'une biopuce activée selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit support solide est fonctionnalisé en présence d'un aminosilane, de préférence le N-(2-aminoéthyl)-3-amino-propyltriméthoxysilane.

7. Procédé de préparation d'une biopuce activée selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit support solide est fonctionnalisé avec une fonction thiol
10 lorsque lesdites sondes oligonucléotidiques sont fonctionnalisées avec une fonction amine terminale.

8. Procédé de préparation d'une biopuce activée selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit support solide est fonctionnalisé en présence de mercaptosilane, de préférence le (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane.

15 9. Procédé de préparation d'une biopuce désactivée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec une fonction amine terminale, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'activation de la biopuce par un procédé de préparation d'une biopuce activée selon la revendication 7 ou 8 ; et

20 b) l'hydrolyse en présence d'une solution aqueuse, de préférence d'eau pure, des fonctions NHS libres des composés espaceurs NHS-PEG-VS de formule (I) fixés sur le support solide.

10. Procédé de préparation d'une biopuce régénérée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées avec une fonction amine
25 terminale, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

A) la désactivation la biopuce par un procédé de préparation d'une biopuce désactivée selon la revendication 9 ;

30 B) la régénération de la biopuce obtenue à l'étape A) en présence de 1-éthyl-3[3(diméthylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) et de NHS des groupements carboxylates obtenus à l'extrémité libre desdits composés espaceurs après hydrolyse des fonctions NHS libres initialement présentes, et, le cas échéant,

C) au moins une étape de lavage de la biopuce obtenue à l'étape B), de préférence en eau déionisée.

11. Procédé de préparation d'une biopuce activée, désactivée ou régénérée selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle la biopuce obtenue est congelée, séchée ou lyophilisée.

12. Procédé de préparation d'une biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

α) la préparation d'une biopuce activée par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ou la préparation d'une biopuce régénérée par un procédé selon la revendication 10 ;

β) le dépôt et la fixation par liaison covalente dans les conditions appropriées desdites sondes oligonucléotidiques préalablement fonctionnalisées avec une fonction thiol, si ledit support solide a été fonctionnalisé avec une fonction amine, ou desdites sondes oligonucléotidiques préalablement fonctionnalisées avec une fonction amine, si ledit support solide a été fonctionnalisé avec une fonction thiol; et, le cas échéant,

γ) l'élimination des sondes oligonucléotidiques non fixées sur le support par au moins une étape de rinçage du support dans des conditions appropriées, de préférence en eau déionisée.

13. Procédé de préparation d'une biopuce comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction thiol et revêtue de sondes oligonucléotidiques selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape suivante :

δ) la désactivation en présence de composés aminés dans les conditions appropriées des fonctions NHS du composé espaceur n'ayant pas interagit avec les fonctions amines des sondes oligonucléotidiques.

14. Procédé de préparation d'une biopuce selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit composé permettant la désactivation des fonctions NHS du composé espaceur à l'étape δ) est choisi parmi les composés aminés possédant une amine primaire, de préférence l'éthanolamine ou le méthoxy-PEG-NH₂.

15. Procédé de préparation d'une biopuce selon la revendication 12 comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction amine et revêtu de sondes oligonucléotidiques, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape suivante :

- 5 δ) la réduction, dans les conditions appropriées, des charges de surface en présence de composés anioniques ou susceptibles d'établir des liaisons covalentes avec les groupements amines et conduire à une espèce neutre ou négative dans les conditions appropriées, de préférence en présence de méthyl N-succinimidyl adipate (MSA).

10 16. Procédé de préparation d'une biopuce revêtu de sondes oligonucléotidiques selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle la biopuce obtenue est conservée à l'abri de l'humidité, de la lumière et/ou en atmosphère inerte.

15 17. Procédé de préparation d'une biopuce activée, désactivée, régénérée ou revêtu de sondes selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que lesdites sondes nucléotidiques sont des ADNs ou ARNs.

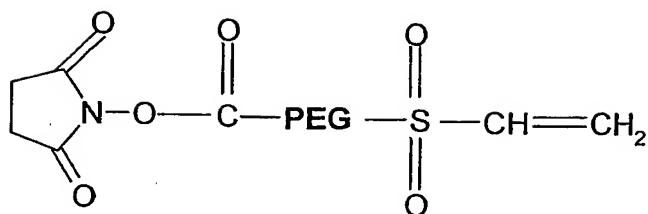
18. Procédé de préparation d'une biopuce selon la revendication 17, caractérisé en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques sont des ADNs ou ARNs monobrins.

20 19. Procédé de préparation d'une biopuce selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques sont des ADNs ou ARNs dont la taille est comprise entre 15 et 7 000 pb.

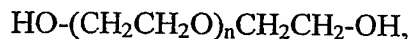
25 20. Procédé de préparation d'une biopuce selon l'une des revendications 12 à 19, caractérisé en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques sont déposées sous la forme de spots dont le diamètre est compris entre 20 µm et 500 µm.

21. Procédé de préparation d'une biopuce selon la revendication 20, caractérisé en ce que le nombre desdits spots de sondes oligonucléotidiques est compris entre 2 et 10⁵.

30 22. Biopuce comprenant un support solide préalablement fonctionnalisé avec une fonction thiol ou amine, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé espaceur NHS-PEG-VS de formule (I) :



dans laquelle PEG désigne le poly(éthylène glycol) de formule



où n est un nombre entier choisi de telle sorte que la masse moléculaire du composé
 5 NHS-PEG-VS de formule (I) est comprise entre 500 et 5000, de préférence comprise
 entre 200 et 4000, de manière plus préférée voisine de 3400,

ledit composé espaceur étant fixé sur ledit support solide par une liaison
 covalente résultant soit de l'interaction entre la fonction thiol dudit support
 fonctionnalisé et la fonction vinylsulfone du composé espaceur de formule (I) ou soit de
 10 l'interaction entre la fonction amine dudit support fonctionnalisé et la fonction NHS du
 composé espaceur de formule (I).

23. Biopuce selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend en
 outre au moins une sonde oligonucléotidique, préalablement fonctionnalisée avec une
 fonction thiol ou amine, fixée sur ledit support solide par une liaison covalente résultant
 15 soit de l'interaction entre la fonction NHS libre dudit composé espaceur de formule (I)
 et une fonction amine de ladite sonde oligonucléotidique, ou soit de l'interaction entre la
 fonction vinylsulfone libre du composé espaceur de formule (I) et une fonction thiol de
 ladite sonde oligonucléotidique.

24. Biopuce selon la revendication 23, caractérisée en ce que lesdites sondes
 20 oligonucléotidiques fixées sont des ADNs ou ARNs monobrans.

25. Biopuce selon la revendication 23 ou 24, caractérisée en ce que lesdites
 sondes oligonucléotidiques fixées sont des ADNs ou ARNs dont la taille est comprise
 entre 15 et 7 000 pb.

26. Biopuce selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisée en ce que
 25 lesdites sondes oligonucléotidiques sont déposées sous la forme de spots dont le
 diamètre est compris entre 20 μm et 500 μm .

27. Biopuce selon l'une des revendications 22 à 26, caractérisée en ce que le nombre de spots de sondes oligonucléotidiques déposés sur la biopuce est compris entre 2 et 10^5 .

28. Biopuce selon l'une des revendications 22 à 27, caractérisée en ce que ledit support solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon[®], en Kevlar[®], en silicone, ou en silicium, de préférence en verre silanisé.

29. Biopuce activée, désactivée, ou régénérées susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 11.

30. Biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques ou de sondes peptidiques, susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 12 à 21.

31. Utilisation d'un biopuce selon l'une des revendications 22 à 30 pour la détection d'acides nucléiques dans un échantillon.

32. Kit pour la détection, l'analyse qualitative ou quantitative d'acides nucléiques dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend une biopuce selon l'une des revendications 22 à 30.

33. Procédé pour la détection d'acides nucléiques dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant les acides nucléiques dont on cherche à détecter la présence sur une biopuce revêtue de sondes oligonucléotidiques selon l'une des revendications 22 à 28 et 30, dans des conditions permettant l'hybridation spécifique de ces acides nucléiques cibles avec lesdites sondes oligonucléotidiques ;

b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions appropriées afin d'éliminer les acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

c) la détection des acides nucléiques capturés sur la biopuce par hybridation.

34. Procédé pour la détection d'acides nucléiques dans un échantillon selon la revendication 33, caractérisé en ce que les acides nucléiques dont on cherche à détecter la présence sont préalablement marqués à une de leur extrémité par un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable, de préférence détectable par fluorescence.

35. Procédé pour la détection d'acides nucléiques selon la revendication 34, caractérisé en ce que les acides nucléiques dont on cherche à détecter la présence sont préalablement marqués pour au moins deux d'entre eux par un marqueur différent.

36. Procédé pour la détection d'acides nucléiques selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce que lesdits marqueurs sont choisis parmi des dérivés de la cyanine, de préférence choisis parmi les dérivés sulfonates de la cyanine, notamment les composés Cy5 ou Cy3, les nanocristaux ou les nanoparticules.

37. Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 22 à 28 et 30 comme matrice d'affinité.

38. Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 22 à 28 et 30 pour la purification d'acide nucléique.

39. Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 22 à 30 pour le séquençage d'acide nucléique.

40. Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 22 à 30 ou 39 pour la détection et/ou l'étude de polymorphisme génétique, notamment de SNP.

41. Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 22 à 28 et 30 pour l'analyse qualitative ou quantitative de l'expression de gènes.

42. Méthode de criblage de composés ou cellules capables de se fixer spécifiquement sur un oligonucléotide donné, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé à tester sur une biopuce selon l'une des revendications 22 à 28 et 30, dans les conditions permettant la fixation spécifique éventuelle dudit composé ou de ladite cellule à tester avec ledit oligonucléotide donné, ladite biopuce comprenant au moins un spot de sondes oligonucléotidiques contenant respectivement lesdits oligonucléotides donnés fixés sur son support solide et, le cas échéant, ledit composé ou ladite cellule étant marqué par un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable ;

b) l'élimination par au moins une étape de lavage dans les conditions appropriées des composés ou cellules à tester non fixés spécifiquement ledit oligonucléotide donné ;
et

c) la sélection du composé ou de ladite cellule spécifiquement fixé sur ledit oligonucléotide donné, le cas échéant, par la sélection du composé ou de ladite cellule dont le signal a été détecté au niveau du spot contenant ledit oligonucléotide donné.

43. Instrument ou dispositif de diagnostic comprenant une biopuce selon
5 l'une des revendications 22 à 30.

1/1

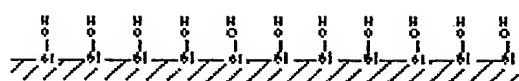


FIGURE 1A

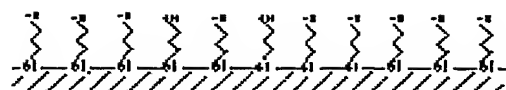


FIGURE 1B

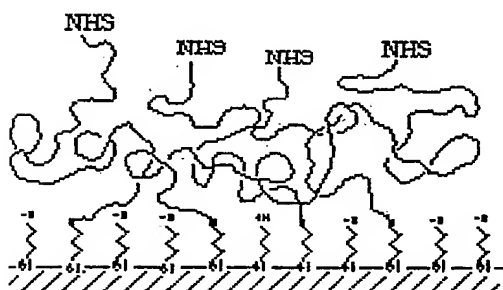


FIGURE 1C

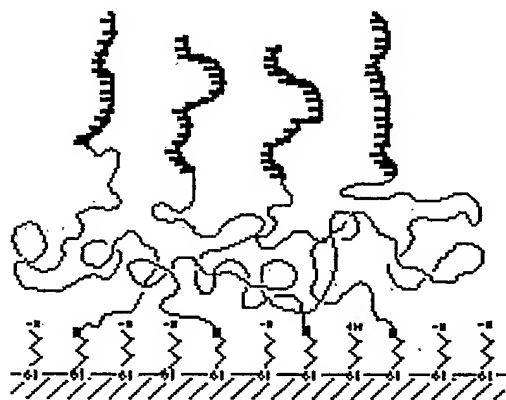


FIGURE 1D

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 août 2003 (21.08.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/068712 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07B 61/00, C07H 21/00, C07K 1/04, C12Q 1/68

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/000464

(22) Date de dépôt international :
13 février 2003 (13.02.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/01791 13 février 2002 (13.02.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : CNRS
(CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016
Paris (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm,
F-75005 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NASOY,
Pierre [FR/FR]; 51 bis, rue du Général Leclerc, F-92130
Issy Les Moulineaux (FR). POTIER, Marie-Claude
[FR/FR]; 42 rue Magenta, F-92600 Asnières (FR). TAL-
INI, M., Luc [FR/FR]; 63, rue Croulebarbe, F-75013
Paris (FR). GIBELIN, Nathalie [FR/FR]; 16, chemin de
la Justice, F-92290 Chatenay Malabry (FR). ROSSIER,
Jean [FR/FR]; 322, rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 25 mars 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL METHOD FOR PRODUCTION OF DNA BIOCHIPS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE BIOPUCES A ADN ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a method for production of an activated biochip for covalent fixing of oligonucleotide probes to a solid support by means of a spacer compound of the NHS-PEG-VS type and biochips produced by the above method. The invention further relates to methods for detection of nucleic acids in a sample or methods for screening compounds which may be specifically bound to oligonucleotide probes in which said biochips are used. The invention also relates to detection kits for, quantitative or qualitative analysis of nucleic acids in a sample, comprising said biochips and use of the above as affinity matrix for purification of nucleic acids, for sequencing nucleic acids, for the qualitative or quantitative analysis of the expression of genes or for the study and detection of genetic polymorphism.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à un procédé de préparation d'une biopuce activée pour la fixation covalente de sondes oligonucléotidiques sur un support solide par l'intermédiaire d'un composé espaceur de type NHS-PEG-VS, ainsi que les biopuces susceptibles d'être obtenues par un tel procédé. L'invention comprend également des méthodes de détection d'acides nucléiques dans un échantillon ou des méthodes de criblage de composés capables de se fixer spécifiquement sur des sondes oligonucléotidiques dans lesquelles sont mises en oeuvre les biopuces selon l'invention. La présente invention a aussi pour objet des kits de détection, d'analyse quantitative ou qualitative d'acides nucléiques dans un échantillon, comprenant de telles biopuces ainsi que l'utilisation de ces dernières comme matrice d'affinité pour la purification d'acide nucléique, pour le séquençage d'acide nucléique, pour l'analyse qualitative ou quantitative de l'expression de gènes ou encore pour l'étude et la détection de polymorphisme génétique.

WO 2003/068712 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Demande internationale No

PCT/FR 03/00464

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07B61/00 C07H21/00 C07K1/04 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07B C07H C07K C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PERRET, EMILIE ET AL: "Versatile decoration of glass surfaces to probe individual protein-protein interactions and cellular adhesion" LANGMUIR (2002), 18(3), 846-854 , 10 janvier 2002 (2002-01-10), XP002220430 page 846 -page 849, colonne de gauche, alinéa 1 page 853, colonne de gauche, alinéa 2 -page 854 ----- -/--	1-9, 11-13, 16-18, 22-24, 28-34, 43

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 juillet 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/07/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Held, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Demande internationale No

PCT/FR 03/00464

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WANG, TONG ET AL: "Protein stretching III: force-extension curves of tethered bovine carbonic anhydrase B to the silicon substrate under native, intermediate and denaturing conditions" JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, PART 1: REGULAR PAPERS, SHORT NOTES & REVIEW PAPERS (1999), 38(6B), 3912-3917 , XP001092793	1-6,12, 22,23, 28-33,43
Y	page 3913, colonne de gauche, ligne 2 - ligne 3 figure 1	1-7,9, 11,12, 16-34, 37-43
X	WO 97 41897 A (VIRION SYSTEMS INC) 13 novembre 1997 (1997-11-13) page 22 -page 25 revendication 1 exemple VIII figures 7A-D	1,3,5, 12,22, 23, 28-33,43
X	WO 95 34326 A (KOHNO TADAHICO ;KACHENSKY DAVE (US); HARRIS MILTON (US)) 21 décembre 1995 (1995-12-21) page 5 revendications 1,11,12 exemple 5	1-3,5, 12,22, 23, 28-33,43
X	NAH J-W ET AL: "Artery wall binding peptide-poly(ethylene glycol)-grafted-poly(l-lysine)-based gene delivery to artery wall cells" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 78, no. 1-3, 17 janvier 2002 (2002-01-17), pages 273-284, XP004329825 ISSN: 0168-3659 page 274, colonne de droite, dernier alinéa -page 275, colonne de gauche, ligne 2 figure 1	1-3,5, 12,22, 23, 28-33,43

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Demande internationale No

PCT/FR 03/00464

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>EP 1 106 603 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 13 juin 2001 (2001-06-13)</p> <p>alinéa '0036! - alinéa '0046! alinéa '0056! - alinéa '0062! alinéa '0071! - alinéa '0073! alinéa '0082! exemples 3,5</p>	1-7,9, 11,12, 16-34, 37-43
A	<p>LUNDBERG, BO B. ET AL: "Conjugation of an anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody, LL2, to long-circulating drug-carrier lipid emulsions" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY (1999), 51(10), 1099-1105 , XP008010201 page 1099 -page 1100</p>	1,22,29, 30,37
A	<p>" Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" SHEARWATER CORPORATION - CATALOG 2001 , 'en ligne! XP002220431 Extrait de l'Internet: <URL:www.shearwatercorp.com> 'extrait le 2002-11-11! page 9, colonne de droite page 4, colonne de gauche, dernier alinéa</p>	1,22
P,X	<p>WO 02 42426 A (NAH JAE WOON ;UNIV UTAH RES FOUND (US); KIM SUNG WAN (US); YU LEI) 30 mai 2002 (2002-05-30)</p> <p>figure 1</p>	1-3,5, 12,22, 23, 28-33,43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Demande internationale No

PCT/FR 03/00464

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9741897	A	13-11-1997	AU 728026 B2	04-01-2001
			AU 3125297 A	26-11-1997
			CA 2253930 A1	13-11-1997
			EP 0930895 A1	28-07-1999
			JP 2000511889 T	12-09-2000
			WO 9741897 A1	13-11-1997
			US 6309646 B1	30-10-2001
WO 9534326	A	21-12-1995	US 6552170 B1	22-04-2003
			AU 2828695 A	05-01-1996
			BG 101095 A	30-09-1997
			BR 9507999 A	12-08-1997
			CA 2191971 A1	21-12-1995
			CN 1158089 A	27-08-1997
			CZ 9603576 A3	12-03-1997
			EE 9600182 A	16-02-1998
			EP 0758906 A1	26-02-1997
			FI 964985 A	16-12-1996
			HU 77529 A2	28-05-1998
			NO 965342 A	14-02-1997
			PL 317894 A1	28-04-1997
			SK 159596 A3	06-08-1997
			WO 9534326 A1	21-12-1995
EP 1106603	A	13-06-2001	JP 2001178466 A	03-07-2001
			JP 2001272402 A	05-10-2001
			EP 1106603 A2	13-06-2001
			JP 3342695 B2	11-11-2002
			JP 2001228152 A	24-08-2001
			JP 2003028871 A	29-01-2003
			US 2003096257 A1	22-05-2003
WO 0242426	A	30-05-2002	US 2001008765 A1	19-07-2001
WO 0242426	A	30-05-2002	AU 4160302 A	03-06-2002
			WO 0242426 A2	30-05-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

International Application No

PCT/FR 03/00464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07B61/00 C07H21/00 C07K1/04 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07B C07H C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	<p>PERRET, EMILIE ET AL: "Versatile decoration of glass surfaces to probe individual protein-protein interactions and cellular adhesion"</p> <p>LANGMUIR (2002), 18(3), 846-854 , 10 January 2002 (2002-01-10), XP002220430</p> <p>page 846 -page 849, left-hand column, paragraph 1</p> <p>page 853, left-hand column, paragraph 2</p> <p>-page 854</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1-9, 11-13, 16-18, 22-24, 28-34,43</p>
---	--	---

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2003

Date of mailing of the international search report

31/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Held, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

International Application No

PCT/FR 03/00464

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WANG, TONG ET AL: "Protein stretching III: force-extension curves of tethered bovine carbonic anhydrase B to the silicon substrate under native, intermediate and denaturing conditions"</p> <p>JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, PART 1: REGULAR PAPERS, SHORT NOTES & REVIEW PAPERS (1999), 38(6B), 3912-3917 , XP001092793</p>	1-6,12, 22,23, 28-33,43
Y	<p>page 3913, left-hand column, line 2 - line 3</p> <p>figure 1</p>	1-7,9, 11,12, 16-34, 37-43
X	<p>WO 97 41897 A (VIRION SYSTEMS INC) 13 November 1997 (1997-11-13)</p> <p>page 22 -page 25 claim 1 example VIII figures 7A-D</p>	1,3,5, 12,22, 23, 28-33,43
X	<p>WO 95 34326 A (KOHNO TADAHIKO ;KACHENSKY DAVE (US); HARRIS MILTON (US)) 21 December 1995 (1995-12-21)</p> <p>page 5 claims 1,11,12 example 5</p>	1-3,5, 12,22, 23, 28-33,43
X	<p>NAH J-W ET AL: "Artery wall binding peptide-poly(ethylene glycol)-grafted-poly(l-lysine)-based gene delivery to artery wall cells"</p> <p>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 78, no. 1-3, 17 January 2002 (2002-01-17), pages 273-284, XP004329825 ISSN: 0168-3659 page 274, right-hand column, last paragraph -page 275, left-hand column, line 2 figure 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-3,5, 12,22, 23, 28-33,43

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

International Application No
PCT/FR 03/00464

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>EP 1 106 603 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 13 June 2001 (2001-06-13)</p> <p>paragraph '0036! - paragraph '0046! paragraph '0056! - paragraph '0062! paragraph '0071! - paragraph '0073! paragraph '0082! examples 3,5</p>	<p>1-7,9, 11,12, 16-34, 37-43</p>
A	<p>LUNDBERG, BO B. ET AL: "Conjugation of an anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody, LL2, to long-circulating drug-carrier lipid emulsions" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY (1999), 51(10), 1099-1105 , XP008010201 page 1099 -page 1100</p>	<p>1,22,29, 30,37</p>
A	<p>" Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" SHEARWATER CORPORATION - CATALOG 2001 , 'Online! XP002220431 Retrieved from the Internet: <URL:www.shearwatercorp.com> 'retrieved on 2002-11-11! page 9, right-hand column page 4, left-hand column, last paragraph</p>	<p>1,22</p>
P,X	<p>WO 02 42426 A (NAH JAE WOON ;UNIV UTAH RES FOUND (US); KIM SUNG WAN (US); YU LEI) 30 May 2002 (2002-05-30)</p> <p>figure 1</p>	<p>1-3,5, 12,22, 23, 28-33,43</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

International Application No

PCT/FR 03/00464

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741897	A	13-11-1997	AU 728026 B2 AU 3125297 A CA 2253930 A1 EP 0930895 A1 JP 2000511889 T WO 9741897 A1 US 6309646 B1	04-01-2001 26-11-1997 13-11-1997 28-07-1999 12-09-2000 13-11-1997 30-10-2001
WO 9534326	A	21-12-1995	US 6552170 B1 AU 2828695 A BG 101095 A BR 9507999 A CA 2191971 A1 CN 1158089 A CZ 9603576 A3 EE 9600182 A EP 0758906 A1 FI 964985 A HU 77529 A2 NO 965342 A PL 317894 A1 SK 159596 A3 WO 9534326 A1	22-04-2003 05-01-1996 30-09-1997 12-08-1997 21-12-1995 27-08-1997 12-03-1997 16-02-1998 26-02-1997 16-12-1996 28-05-1998 14-02-1997 28-04-1997 06-08-1997 21-12-1995
EP 1106603	A	13-06-2001	JP 2001178466 A JP 2001272402 A EP 1106603 A2 JP 3342695 B2 JP 2001228152 A JP 2003028871 A US 2003096257 A1 US 2001008765 A1	03-07-2001 05-10-2001 13-06-2001 11-11-2002 24-08-2001 29-01-2003 22-05-2003 19-07-2001
WO 0242426	A	30-05-2002	AU 4160302 A WO 0242426 A2	03-06-2002 30-05-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)